

Título: Influência do tipo de exposição primária e da infiltração eosinofílica no desenvolvimento da imunidade protetora induzida durante a re-infecção de *Strongyloides venezuelensis* em camundongos.

Durante a infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos, assim como outros nematódeos intestinais, a participação de eosinófilos no mecanismo de proteção bem como na imunopatologia ainda é bastante controversa. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstram que o eosinófilo é uma célula importante no processo de eliminação do *S. venezuelensis* em casos de infecção primária pelo parasito. Porém, sabe-se que os mecanismos protetores que atuam em animais previamente expostos ao parasito atuam principalmente sobre as larvas migrantes e podem diferenciar da resposta efetora em infecções primárias. Outro fato importante é que a maioria dos resultados obtidos em experimentos laboratoriais é controversa, uma vez que protocolos experimentais geralmente utilizam a exposição do hospedeiro a uma carga parasitária muito elevada, que geralmente não acontece em processos naturais. No intuito de esclarecer a diferença de resposta imunológica e o papel do eosinófilo na resposta imune induzida por diferentes formas de exposição primária ao parasito este trabalho experimental utilizou três diferentes linhagens de camundongos: animais heterogênicos da linhagem Swiss, animais isogênicos da linhagem Balb/c e animais Balb/c Δ dbiGATA, deficientes na maturação de eosinófilos. Em cada linhagem os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais. Sendo que um grupo foi mantido não infectado, outro sofreu apenas uma infecção, o outro foi exposto à infecção primária com alta carga parasitária seguida de infecção secundária e o último foi exposto a várias infecções com baixo número de larvas infectantes antes do desafio com *Strongyloides*

venezuelensis. A avaliação comparativa da infecção foi realizada através da quantificação de formas evolutivas de *S. venezuelensis* recuperadas do pulmão, intestino, e fezes dos camundongos. Parâmetros imunológicos, como análise do infiltrado celular nos parênquimas pulmonar e intestinal, da resposta sorológica pela técnica de ELISA, e análise da presença de citocinas do perfil Th-2 no parênquima pulmonar também foram comparativamente analisados. Os dados mostram que animais submetidos às múltiplas infecções com baixa dose parasitária eliminam as larvas da infecção desafio mais precocemente que os previamente expostos a uma alta carga parasitária. A eliminação das larvas foi associada à produção de anticorpos específicos e eosinofilia tecidual. Estudo detalhado em animais isogênicos revelou que nos animais previamente expostos ao parasito houve aumento precoce de IgG1 e IgM parasito-reativa e aumento nos níveis de IgE total, não sendo detectado aumento de reatividade de IgG2a nos animais re-infectados ou nos animais submetidos múltiplas infecções. Apesar do perfil Th-2 da resposta observada nos animais previamente expostos ao parasito e da intensa infiltração de eosinófilos na pele e pulmão destes animais, a proteção conferida aos hospedeiros durante o processo de re-infecção, nas diferentes formas de exposição primária ao parasito, não foi alterado na ausência de eosinófilos. Este resultado indica que o eosinófilo não é essencial para eliminação das larvas de *S. venezuelensis* em animais previamente expostos ao parasito.

RESUMO

Durante a infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos, assim como outros nematódeos intestinais, a participação de eosinófilos no mecanismo de proteção bem como na imunopatologia ainda é bastante controversa. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstram que o eosinófilo é uma célula importante no processo de eliminação do *S. venezuelensis* em casos de infecção primária pelo parasito. Porém, sabe-se que os mecanismos protetores que atuam em animais previamente expostos ao parasito atuam principalmente sobre as larvas migrantes e podem diferenciar da resposta efetora em infecções primárias. Outro fato importante é que a maioria dos resultados obtidos em experimentos laboratoriais é controversa, uma vez que protocolos experimentais geralmente utilizam a exposição do hospedeiro a uma carga parasitária muito elevada, que geralmente não acontece em processos naturais. No intuito de esclarecer a diferença de resposta imunológica e o papel do eosinófilo na resposta imune induzida por diferentes formas de exposição primária ao parasito este trabalho experimental utilizou três diferentes linhagens de camundongos: animais heterogênicos da linhagem Swiss, animais isogênicos da linhagem Balb/c e animais Balb/c Δ dblGATA, deficientes na maturação de eosinófilos. Em cada linhagem os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais. Sendo que um grupo foi mantido não infectado, outro sofreu apenas uma infecção, o outro foi exposto à infecção primária com alta carga parasitária seguida de infecção secundária e o último foi exposto a várias infecções com baixo número de larvas infectantes antes do desafio com *Strongyloides venezuelensis*. A avaliação comparativa da infecção foi realizada através da quantificação de formas evolutivas de *S. venezuelensis* recuperadas do

pulmão, intestino, e fezes dos camundongos. Parâmetros imunológicos, como análise do infiltrado celular nos parênquimas pulmonar e intestinal, da resposta sorológica pela técnica de ELISA, e análise da presença de citocinas do perfil Th-2 no parênquima pulmonar também foram comparativamente analisados. Os dados mostram que animais submetidos às múltiplas infecções com baixa dose parasitária eliminam as larvas da infecção desafio mais precocemente que os previamente expostos a uma alta carga parasitária. A eliminação das larvas foi associada à produção de anticorpos específicos e eosinofilia tecidual. Estudo detalhado em animais isogênicos revelou que nos animais previamente expostos ao parasito houve aumento precoce de IgG1 e IgM parasito-reativa e aumento nos níveis de IgE total, não sendo detectado aumento de reatividade de IgG2a nos animais re-infectados ou nos animais submetidos múltiplas infecções. Apesar do perfil Th-2 da resposta observada nos animais previamente expostos ao parasito e da intensa infiltração de eosinófilos na pele e pulmão destes animais, a proteção conferida aos hospedeiros durante o processo de re-infecção, nas diferentes formas de exposição primária ao parasito, não foi alterado na ausência de eosinófilos. Este resultado indica que o eosinófilo não é essencial para eliminação das larvas de *S. venezuelensis* em animais previamente expostos ao parasito.

ABSTRACT

The role of eosinophils in the protection and in the immunopathology caused by *Strongyloides venezuelensis* infection remains unclear. Early works from our research group have shown that the eosinophil is an important cell during the

process of elimination of *S. venezuelensis* during a primary infection. But, it is a known fact that the mechanism involved in the protection of previously infected animals aims the larvae stage of the parasite and, this may affect the protective immune response. Another important fact is that the majority of the results of laboratories studies is obtained after the host is exposed to a large number of infective larvae, which normally do not reflected the situation found in the natural process. To clarify the difference in the immune response and the role of eosinophils in the immune response induced by different ways of primary contact with the parasite, this experimental work used three different lineages of mice: the heterogeneous Swiss, the isogenic Balb/c and the isogenic deficient mice Balb/c Δ dblGATA (animals with a selective deficiency in eosinophil differentiation). In each lineage the mice was divided in four experimental groups. One group remained uninfected, the other one was exposed to only one infection with the parasite, the other was infected with a large number of larvae and challenged, and the last one was exposed to multiple infections with a low number of larvae and then was challenged with *S. venezuelensis*. The evaluation of the infection was done by quantification of larvae in lung, adult worms in small intestine and eggs in the feces of the host. Immunologic parameters like the analysis of the cellular infiltrated in the lungs and in the intestine, the serological response by the ELISA and the analysis of the presence of Th-2 cytokines in the lung was comparatively analyzed. The data show that mice exposed to multiple infections with a small number of larvae eliminated the larvae of the challenge infection earlier than those infected and challenged. The elimination of the larvae was associated to antibody production and to tissue eosinophilia. The animals previously exposed to the parasite

showed an early increase of IgG and IgM parasite-specific and increased levels of total IgE, but no parasite-specific IgG2a production was detected in the challenged animals or in the animals exposed to multiple infections. Despite of the Th-2 immune response observed in the previously infected mice and the intense infiltration of eosinophils in the skin and lungs of these animals, the protection against challenge infection with *S. venezuelensis* was not affected by absence of eosinophils, showing that eosinophils are not essential to eliminate the larvae in pre-exposed mouse.